

PATENT ABSTRACTS OF JAPAN

(11)Publication number : 2000-342236

(43)Date of publication of application : 12.12.2000

(51)Int.Cl.

A23L 3/3499
A23B 4/00
A23B 4/14
A23K 1/00
A23K 1/16
A23L 3/3472

(21)Application number : 2000-089169

(71)Applicant : IWAI KAZUO

(22)Date of filing : 28.03.2000

(72)Inventor : IWAI KAZUO

(30)Priority

Priority number : 11090665 Priority date : 31.03.1999 Priority country : JP

(54) WATER-BASED MICROBICIDAL AGENT FOR FOOD

(57)Abstract:

PROBLEM TO BE SOLVED: To provide a water-based microbicidal agent by selecting hinokitiol that occurs in nature and has a strong microbicidal power in order to eliminate food intoxication caused by foods and solves the problems on the hinokitiol that it has a strong smell, an irritating taste and low solubility in water, in this case the high solubilization of hinokitiol in water is needed, this water-based microbicidal agent is given to domestic animals and poultry to kill the food intoxication microorganisms in the bodies.

SOLUTION: Extracts of aloe, green tea, Kumazasa leaves (a kind of bamboo) and Houttuynia cordata and two or more kinds of plant extracts having the same level of the functions as that of the above-stated extracts are added to hinokitiol to compensate the defects of the hinokitiol. This water-based microbicidal agent is directly given to domestic animals and poultry to reduce the cell numbers of colon bacillus, Salmonella or the like. In order to diversify the practical applications, a surfactant, an emulsifier are added to the microbicidal agent to increase the concentration of hinokitiol in the aqueous solution.

LEGAL STATUS

[Date of request for examination]

[Date of sending the examiner's decision of rejection]

[Kind of final disposal of application other than the examiner's decision of rejection or application converted registration]

[Date of final disposal for application]

[Patent number]

[Date of registration]

[Number of appeal against examiner's decision of rejection]

(19) 日本国特許庁 (J P)

(12) 公開特許公報 (A)

(11) 特許出願公開番号

特開2000-342236

(P2000-342236A)

(43) 公開日 平成12年12月12日 (2000. 12. 12)

(51) Int.Cl. ⁷	識別記号	F I	テームト* (参考)
A 2 3 L 3/3499		A 2 3 L 3/3499	2 B 1 5 0
A 2 3 B 4/00		A 2 3 K 1/00	1 0 3 4 B 0 2 1
	4/14	1/16	3 0 1 B
A 2 3 K 1/00	1 0 3		3 0 4 C
1/16	3 0 1	A 2 3 L 3/3472	
審査請求 未請求 請求項の数 5 O L (全 17 頁) 最終頁に続く			

(21) 出願番号 特願2000-89169 (P2000-89169)

(22) 出願日 平成12年3月28日 (2000. 3. 28)

(31) 優先権主張番号 特願平11-90665

(32) 優先日 平成11年3月31日 (1999. 3. 31)

(33) 優先権主張国 日本 (J P)

(71) 出願人 593186367

岩井 一夫

滋賀県野洲郡野洲町大字小篠原1221番地の
1

(72) 発明者 岩井 一夫

滋賀県野洲郡野洲町大字小篠原1221番地の
1

Fターム (参考) 2B150 AA01 AA05 AB20 CA20 DA06

DD31 DD57

4B021 MC01 MK05 MK17 MP02 MP03

MP10

(54) 【発明の名称】 食品用水成殺菌剤

(57) 【要約】

【課題】 本発明の目的は、食品による食中毒事故を無くす為に天然系で強い殺菌力を持つヒノキチオールを選んだが、このヒノキチオールの欠点である強臭、刺激味、低水溶性等を解決し、安全で強力な食品用水成殺菌剤を提供する事である。実用的にする為にヒノキチオールの高濃度水溶化が必要とされる。又、この水成殺菌剤を家畜、家禽に与える事により、体内の食中毒菌を殺菌する。

【解決手段】 課題を解決するにあたり、アロエ、緑茶、熊笹、ドクダミの抽出液及び、これらと同等の機能を持つ2種以上の植物抽出物をヒノキチオールに加える事によって、前出のヒノキチオールの欠点を補い、問題を解決する事が出来た。今回発明の水成殺菌剤を直接家畜、家禽に与える事により、大腸菌やサルモネラ菌等の細菌を減らす事が出来た。又、用途の多様化、実用化を図る為に界面活性剤、乳化剤を加える事により、水溶液に含まれるヒノキチオールを高濃度化する事を発明した。

【特許請求の範囲】

【請求項 1】 ヒノキチオールを主成分とし、アロエ、緑茶、熊笹、どくだみの抽出物からなる食品の食中毒防止を目的とする水成殺菌剤

【請求項 2】 請求項 1 記載の水成殺菌剤を牛、鶏、豚等の食肉に浸漬及び塗布、噴霧することにより、食肉による食中毒防止を目的とする水成殺菌剤

【請求項 3】 請求項 1 記載の水成殺菌剤を家畜、家禽に直接飲ませるか、飼料に添加する事で、これら家畜、家禽の持つ体内の食中毒菌を殺菌する事を目的とする水成殺菌剤

【請求項 4】 請求項 1 記載のヒノキチオールにアロエ、緑茶、熊笹、ドクダミの抽出物及びこれらと同等の機能を持った植物の 2 種以上のこれら抽出物を加えることにより、食品の食中毒防止を目的とする水成殺菌剤

【請求項 5】 請求項 1 及び 4 記載の水成殺菌剤に界面活性剤・乳化剤を添加する事により、この水成殺菌剤に含まれるヒノキチオールを高濃度化した水溶液

【発明の詳細な説明】

【0001】

【産業上の利用分野】 本発明はヒノキチオールの持つ殺菌力と、アロエ、緑茶、熊笹、どくだみの持つ可溶性、消臭力、刺激味を緩和する事を附加する事により、安全で、無味、無臭に近く、食品に附着する食中毒の原因となる細菌に殺菌効果の高い食品用水成殺菌剤に関するものである。

【0002】

【従来の技術】 一般に食中毒の原因となるサルモネラや O157 を始めとする大腸菌の除去手段については、アルコール類、次亜塩素酸ソーダ、リン酸ナトリウム、ソルビン酸等があるが、安全性及び効果等については有効性が小さい。例えば代表的な殺菌剤である、次亜塩素酸ソーダは水道水の殺菌や多くの食品の殺菌洗浄に用いられているが、アルカリ性では効果が無い。弱酸性水がそれ以上の酸性水では効果が認められており、この為、酸性水を加えるなり酸化剤を加えるなどにより、酸性水と次亜塩素酸ソーダによる殺菌剤及び殺菌装置は医療や食品の現場で使用されている。しかし周りの鉄分と化学反応を起こし設備の錆びにつながったり等で使用場所が限定されている。実際に食品製造現場では単に水溶化して使用するケースが多く、また元々がアルカリ性である為、単に水溶化するだけでは O157 やサルモネラに殺菌効果はない。食品に附加して殺菌効果を出せる安全な殺菌剤は多くなく、それ故に食品が原因となる食中毒事故は後がたらず増加している傾向さえある。大阪府堺市でおきた病原性大腸菌の O157 による学童の学校給食による集団食中毒事件の記憶は新しい。

【0003】

【発明が解決しようとする課題】 この食中毒の原因となる細菌を殺菌するのが最終目的であるが、食品というも

っとも高い安全性が要求されるものにつく細菌を殺菌する為、食品の性質を変えない為にも、ノンアルコールである事、無味・無臭に近いものである事、医薬品並みの安全性が証明される事、そして高い殺菌力を有し、手軽で簡単に食品に使用出来るために水成化されている事が課題となる。

【0004】

【課題を解決する手段】 課題を解決するにあたり、発明者は従来強い抗菌力を持つ事で知られているヒノキチオールに注目し解決をしようとみたが、ヒノキチオールの欠点である臭いがきつく、刺激味があり、水溶性が悪く、紫外線に弱いという欠点を持ち合わせている為にヒノキチオール単体での使用は難しいことが理解できた。しかし、植物性成分を加える事により、これらの問題を解決する事を発明者は見出し、その植物の中より、アロエ、柿の葉、緑茶、熊笹、どくだみの持つ成分をそれぞれの抽出方法で抽出、これらを混ぜる事により水溶化し、臭いが少なく紫外線にも影響が小さい水成殺菌剤を作成することが出来た。刺激臭もやわらかくなり、口も含んでもわずかなハッカに近い味がするだけで、後述するがこの水溶液の成分試験を公的な機関で行い、直接食品にかけても問題がないことがわかった。アロエ、緑茶、熊笹、ドクダミ以外の同様の機能を持った植物として、柿の葉、あま茶ズル、シソ、ワサビ、アカネ、ウメ、ニンニク、ハッカ、ヨモギ、サンショ、ダイオウ、アザミ、ビワ、ムラサキ、ラベンダー、レモングラス、レンギョウの抽出物でこれらの抽出方法にはアルコール抽出法、熱水、蒸煮抽出法、厚搾抽出法、溶剤抽出法がある。

【0005】

【発明の実施の形態】 次に今回の発明を説明する。主成分のヒノキチオールは、前述の様に水溶性が悪い等単体では多くの欠点をもちあわせているが、本発明はそれらを補う成分を加える事により、これらの問題点を解決する事が出来た。特に食品としての利用をはかる為に、食品もしくは食品添加物として許可されている成分を加える事に重点をおいた。

【0006】 前述のヒノキチオールの欠点を補う為に、本発明はアロエ、緑茶、熊笹、どくだみの抽出液を混ぜて水を加える事により水成化する事により解決した。これら植物混合液は界面活性機能及び消臭機能、刺激味を緩和する機能を持ち、またヒノキチオール程ではないが殺菌性を持ち、消臭機能は他の臭いを消すことも可能で、ヒノキチオールと混合することにより、ヒノキチオール単体と比べ後述するが殺菌効果も向上した。

【0007】 今回の発明により、新しい効果が次々とあらわれてきた。従来ヒノキチオールの水溶率は理論値では 0.2% が限界といわれ実際には 0.1% が限界であるが、今回の発明では液の温度を 60℃ から 80℃ に上げ、攪拌機でかきまわす事により、最大 1% までヒノキ

チオールを水溶化する事が出来た。又、エタノールを加えるとヒノキチオールを5%ぐらいまで加溶化することは周知のことであるが、今回の課題では食品に使用する為、ノンアルコールであることが必要で利用出来ず、本発明ではグリセリン脂肪酸エステル等の界面活性剤、キラヤサポニン等の植物系乳化剤を加え、ホモジナイザー（乳化機）を使用する事により、アルコール分なしでヒノキチオールを10%まで水溶化する事が出来た。

【0008】ヒノキチオールは食品添加物として許可されており、高砂香料（株）や大阪有機化学工業より販売されており、歯磨き剤や養毛剤それに幾つかの食品に防カビ剤等で使用されているが、水溶液にして直接食品にかけたり漬けたりして、食品用殺菌剤として使用するという事は無かった。ヒノキチオールは粉状もしくは結晶状で前述のごとく水に溶けにくい性質をもつが、融点が48℃から52℃で、これ以上の水温では溶けるが水温が下がれば結晶にもどる。

【0009】ヒノキチオール以外のアロエ、緑茶、熊笹、どくだみの抽出方法について述べる。ここで使用するアロエは、主にアロエが葉に持つゼリー状の身より厚搾抽出法で抽出し、熱を加え濃縮安定化したエキスを使用し、緑茶については緑茶を粉砕し抽出を行い、精製し濃縮した液を使用し、熊笹、どくだみについては低温高圧搾抽出法という方法で抽出する。これは圧力をあげた機械装置によって温度を上げずに抽出出来る方法で、その時にしぼり出された液を濃縮した液が熊笹、ドクダミの抽出物である。

【0010】これらヒノキチオールとアロエ、緑茶、熊笹、どくだみの比率は使用する目的によって異ってくるが、水1000gに対してヒノキチオールを50μg～100g、アロエは20μg～100g、緑茶は20μg～

*g～100g、熊笹は10μg～50g、どくだみは10μg～50gの範囲で使用する。

【0011】成分比率について例を示す。これらは特許請求の範囲を固定しない。実際に食品用の殺菌剤として使用する上で、経済的にも効果的にもヒノキチオールの含有分が125ppmが一番良いという事がわかった。その時に使用する成分割合は次の通りである。ヒノキチオール0.125%、アロエ0.11%、緑茶0.105%、熊笹0.09%、どくだみ0.08%、合計0.51%、水（精製水が望ましい）99.49%となる。

【0012】使用形態としては段落番号11で示した液を食物に直接かける、浸漬する、噴霧する事で使用する。例えば野菜、特にカット調理されたキャベツやキュウリ等に使用される。

【0013】とり肉、牛肉、豚肉、その他の食肉がもつ細菌については、例えばとり肉のサルモネラ、カンピロバクターが有名であり、牛の病原性大腸菌O157はあまりにも有名である。

【0014】本発明はとり肉に対してサルモネラの殺菌効果を確証済で以下の通りとなる。

【0015】検査方法。屠殺されたにわとりの屍体を段落番号11で示した液に30秒間、2分間、3分間浸漬し、その結果を何も処理をしなかった屍体との細菌数を比較してみた。細菌数の測定方法にはフードスタンプのサルモネラ寒天培地（MLCB寒天）日本製を使用した。このフードスタンプを検体に軽く押え、37℃、24時間培養する事により附着した細菌が培養される。フードスタンプ1個の培地面積は10cm²である。

【表1】

	24時間	48時間	72時間
30秒	—	+	+
2分間	—	—	+
3分間	—	—	—
無処理	++	+++	+++

—育成なし、+育成あり、+++育成大

従って3分間以上浸漬した場合は効果があった。

【0016】今回の発明は発明した水成殺菌剤を食品にかける事と、特に食肉については対象となる家畜、家禽の飼料に添加する事にしたり、飲用させる事により、家畜、家禽の腸内で作成される細菌を殺菌する事を考案した。その前に安全性を確かめる為に次の実験を行った。

【0017】段落番号11で示された液を乳酸菌2種、黒麹かび、大腸菌、黄色ブドウ球菌を使用して抗細菌効力試験を行った。（大阪市立工業試験所、平成11年6月～7月）試験方法：乳酸菌（*Lactobacilli*

us Plantarum IFO 3090, *Lactococcus lactis* ATCC11454）をペプトン（0.5%）、酵母エキス（0.25%）、グルコース（0.1%）、寒天（1.5%）を加え、100℃で10分間煮沸し、シャーレに20ml注入し、寒天平板培地を調製した。この寒天平板上に先に培養した乳酸菌を接種し、30℃で2日間培養して、菌の生育を観察した。対照は試料の代わりに水を用いて寒天平板培地を作成した。

【表2】

試料名	結 果	
	<i>Lactobacillus Plantarum</i>	<i>Lactococcus lactis</i>
ヒノキチオール 125PPMを含む液	菌の生育が認められた	菌の生育が認められた
対 照	菌の生育が認められた	菌の生育が認められた

【0018】同様に黒黴かびの効果テストを行った。試験方法：黒黴かび (*Aspergillus niger* ATCC 6275) をポテトデキストロース寒天培地 (PH6) で28℃、7日間培養した。試料にペプトン (0.5%)、酵母エキス (0.25%)、グルコース (0.1%)、寒天 (1.5%)、を加え、100℃

*℃で10分間煮沸し、シャーレに20ml注入し、寒天平板培地を調製した。この寒天平板上に先に培養したかびの胞子を接種し、30℃で7日間培養して、菌の生育を観察した。対照は試料の代わりに水を用いて寒天平板培地を作成した。

【表3】

試料名	結 果
	黒 黴 か び
ヒノキチオール 125PPMを含む液	菌の生育は認められなかった
対 照	菌の生育が認められた

【0019】次に大腸菌と黄色ブドウ球菌について効果テストを行った。試験方法：大腸菌 (*Escherichia coli* IFO3301)、黄色ブドウ球菌 (*Staphylococcus aureus* IFO12732) をペプトン (0.5%)、酵母エキス (0.25%)、グルコース (0.1%)、(PH7) 培地で30℃拡張培養した。試料にペプトン (0.5

※%)、酵母エキス (0.25%)、グルコース (0.1%)、寒天 (1.5%) を加え、100℃で10分間煮沸し、シャーレに20ml注入し、寒天平板培地を調製した。この寒天平板上に先に培養した菌を接種し、30℃で5日間培養して菌の生育を観察した。対照は試料の代わりに水を用いて寒天平板培地を作成した。

【表4】

	結 果	
	大 腸 菌	黄色ブドウ球菌
ヒノキチオール 125PPMを含む液	菌の生育は認められなかった	菌の生育は認められなかった
対 照	菌の生育が認められた	菌の生育が認められた

【0020】以上の結果今回の発明は乳酸菌には効果がなく、サルモネラや大腸菌、黒黴かびに効果があり、後述する段落番号38から段落番号58までの各種実験データからも家畜や家禽に直接与えても効果がえられる事が解った。

【0021】次に本発明は、液そのものを直接家畜に飲ます方法と飼料に混ぜる方法を考案した。一例として平均的に飼料と混ぜる方法としてこの液に中間剤を加え、それを飼料に添加して攪拌し、平均に1日の量をとれる事を考えた。この中間剤には大麦粉末、小麦粉末、米粉があるが安いコスト、高栄養価である豆腐のしぼりカスであるオカラを中間剤として使用した例を示す。

【0022】本発明のヒノキチオール、アロエ、緑茶、熊笹、どくだみの抽出エキスをオカラと混ぜる事により家畜、家禽の飼料添加剤とし、家畜、家禽の胃、腸内で生成される食中毒菌を殺菌する事を目的とする。

【0023】1例としてにわとり用の混合率は以下の通りであるが、この混合率については家畜、家禽により、又季節により異なってくる。オカラ1kgに対して、本発明ヒノキチオール10g、緑茶10g、アロエ10g、熊笹5g、どくだみ3gの水溶液を混合し、減圧乾燥機を使用して、含水率10%前後に乾燥を行い、顆粒状にし添加剤を作成した。

【表5】

添加剤1kgの場合			使用範囲
ヒノキチオール	10g	(1%)	10%~0.1%
アロエ	10g	(1%)	5%~0.05%
緑茶	10g	(1%)	5%~0.05%
熊笹	5g	(0.5%)	2%~0.02%
どくだみ	3g	(0.3%)	2%~0.005%
おから	962g		

【0024】段落番号23で作成されたにわとり用の添加剤は飼料1000kgに対して1kgを添加する。これは平均的なにわとりが1日当り食する飼料が100g前後であり、従って、にわとりがヒノキチオールを摂取する量は0.001%、10PPMとなる。5PPM~100PPMが有効範囲と考える。場合によってはこの添加剤を分量を変えて直接飼料として与える事もある。

【0025】次に本発明はヒノキチオールを主成分にアロエ、緑茶、熊笹、どくだみで作成した抽出液に界面活性剤、乳化剤を混ぜる事により、高濃度のヒノキチオール分を水溶化する事が出来る。その1例として、ヒノキチオール10%、アロエ9%、緑茶8%、熊笹6%、どくだみ5%に界面活性剤の一種であるグリコール脂肪酸エステルを1%、食物性乳化剤サポニン1%、水60%を攪拌器の一種であるホモジナイザーを使用し、60℃~80℃の水温で1時間程攪拌する事により乳白色状の濃い水溶液を作成する事が出来た。また、段落番号4で取り上げた、柿の葉、あま茶ズル、シソ、ワサビ、アカネ、ウメ、ニンニク、ハッカ、ヨモギ、サンショ、ダイオウ、アザミ、ビワ、ムラサキ、ラベンダー、レモングラス、レンギョウの抽出液の2種以上の組み合わせ混合液とヒノキチオール、界面活性剤、乳化剤の混合により、高濃度化も可能である。ヒノキチオール単体と界面活性剤、アルコールの組み合わせでも出来る。アルコール分が添加される事による弊害も起こるが、ヒノキチオールを高濃度化する手段のひとつである。この高濃度の水溶化技術はヒノキチオールの活用範囲を広げるもので、液の輸送面、大量の液を作成する場合等、多くのメリットが生まれる。例えば本発明の目的の1つであるとり肉*

菌の発育状態 + : 菌の発育確認 - : 生育を認めず

薬剤濃度	100倍希釈	50倍希釈	20倍希釈	10倍希釈
大腸菌	+	+	-	-
黒カビ	+	+	-	-

【0029】実験例2

ヒノキチオール単体と本発明との殺菌力比較試験を行った。ヒノキチオールを水1000gに対して1gを水溶化した。殺菌性能試験MIC（最小発育阻止濃度）試験株：大腸菌 *Escherichia coli* (IFO 3972)、黒カビ *Aspergillus niger* (IFO 4414)

菌の発育状態 + : 菌の発育確認 - : 生育を認めず

薬剤濃度	100倍希釈	50倍希釈	20倍希釈	10倍希釈
大腸菌	+	+	+	-
黒カビ	+	+	+	-

【0031】次に上記の標準的な濃度の本発明を、食品として使用するための試験を行う事にした。

【0032】実験例3

前述のテストサンプルであるLNB1000を、10倍

*の洗浄（殺菌）に使用する時はかなりの水量、10トン単位の水の中で使用せねばならないが、使用範囲のヒノキチオール分100PPMを確保するにも10%液であれば10kgの投入ですむ。従来の技術ではヒノキチオールと水では0.2%、アルコールやその他の添加剤を入れても1%が最大であったのが10%になる事により、より具体的に実用化となった。

【0026】実施例

次に本発明の実施例を上げて具体的に説明を行う。

10 殺菌効果試験

ここでは食品としての熱処理を行う前と後の効果試験を行った。

【0027】実験例1

本発明の標準的なもの、つまりヒノキチオールを水1000gに対して1g、植物添加剤であるアロエ、緑茶、熊笹、どくだみの抽出液を1.65g入れたもの（社内コードLNB1000）を使用した。LNB1000（殺菌剤）を以下の通りで実験を行った。殺菌性能試験MIC（最小発育阻止濃度）試験菌株：大腸菌 *Escherichia coli* (IFO3972)、黒カビ *Aspergillus niger* (IFO4414)

【0028】試験方法1

10~100g/Lの試料を含む寒天平板培地に試験菌株を接種し、最小発育阻止濃度（MIC）を測定した。但し、大腸菌の培養には普通寒天培地、黒カビの培養にはポテトデキストロース寒天培地を30℃ 7日間培養し、発育状態を観察した。試験結果

【表6】

※【0030】試験方法

10~100g/Lの試料を含む寒天培地に試験菌株を接種し、最小発育阻止濃度（MIC）を測定した。但し、大腸菌の培養には普通寒天培地、黒カビの培養にはポテトデキストロース寒天培地を30℃ 7日間培養し、発育状態を観察した。

※【表7】

菌の発育状態 + : 菌の発育確認 - : 生育を認めず

薬剤濃度	100倍希釈	50倍希釈	20倍希釈	10倍希釈
大腸菌	+	+	+	-
黒カビ	+	+	+	-

希釈をA、20倍希釈をBとして実験を行った。

試験菌株：大腸菌 *Escherichia coli* (IFO 3972)

50 黒カビ *Aspergillus niger* (IF

O 4414)

【0033】試験方法

A、B両液に普通寒天平板培地、ポテトデキストロース寒天培地を液に対して3.5wt%加えて70℃に加熱し均一に分散させた。分散後、滅菌シャーレに10ml*

*注ぎ、冷却凝固させた。これに試験菌株を接種し、30℃ 7日間培養し、発育状態を観察した。但し、大腸菌の培養には普通寒天平板培地、黒カビの培養にはポテトデキストロース寒天培地を用いた。

【表8】

A 菌の発育状態 + : 菌の発育確認 - : 生育を認めず

試験日	1	2	3	4	5	6	7
大腸菌	-	-	-	-	-	-	-
黒カビ	-	-	-	-	-	-	-

【表9】

B 菌の発育状態 + : 菌の発育確認 - : 生育を認めず

大腸菌	-	-	-	-	-	-	-
黒カビ	-	-	-	-	-	-	-

表7、表8、表9を比較してヒノキチオール単体より本発明の殺菌力が高い事が示された。

【0034】実験例4

次にO157やMRSA、黄色ぶどう球菌、サルモネラの4種のテストを行った。これらのテストは社団法人日本食品衛生協会で行った。この時に使用したものは、社内コードをLHB2000と呼ばれるものを使用した。試験菌：1. 黄色ぶどう球菌 MRSA (Staphylococcus aureus IFO12, 732)、2. 腸管出血性大腸菌O157 (Escherichia coli IID959)、3. サルモネラ (Salmonella Typhimurium IFO 12529) 図面図1の設備を使用して行っ

※た。

【0035】試験方法

- 20 普通ブイヨン培地で35℃ 18時間培養菌液を100倍希釈したものを菌液とした。感受性ディスク用培地に、菌液0.1mlをコンラージ棒にて塗抹し、試料を気化し循環させた箱(40×40×100cm)に所定の時間入れ、薬剤と作用させる。感作後、平板を取り出し35℃、48時間培養後、菌の有無を観察する。作用時間：試験開始時、15分間、30分間、1時間、2時間、4時間、8時間 環境条件：湿度99%、温度25℃、空気取り入れ口1/3開口

【0036】試験結果

【表10】

菌の発育状態 + : 菌の発育確認 - : 生育を認めず

試験菌	試験開始時	15分間	30分間	1時間	2時間	4時間	8時間
MRSA	+++ (2.3×10^5)	++ (5.0×10)	-	-	-	-	-
大腸菌 O157	+++ (4.5×10^5)	++ (1.3×10^2)	-	-	-	-	-
サルモネラ	+++ (2.1×10^5)	++ (2.3×10^2)	+ (8×10)	-	-	-	-

【0037】実験1, 2, 3, 4, の結果を見る様に今回の発明はその性能を十分に発揮し、効果を得る事が証明出来た。

【0038】安全性試験

次に安全性について実験を行った。このテストも一番濃度の濃いLHB2000を選んだ。これは実際使用する場合、これ以上濃いものはなく、10倍前後薄めて使用

するのが通常である為である。

【0039】重金属及び毒物分析試験

この成分内における残留農薬の分析試験テストを行った。この試験は財団法人日本食品分析センターで行った。この結果本発明の殺菌剤から重金属類や毒物等は検出されなかった事が解る。

【表11】

11
分析試験結果

分析試験項目	結果	検出限界	分析方法
比重 (15℃)	1.000		浮秤計法
pH	10.1		ガラス電極法
EPN	検出せず	0.05ppm	ガスクロマトグラフ法
パラチオン	検出せず	0.05ppm	ガスクロマトグラフ法
メチルジメトン	検出せず	0.05ppm	ガスクロマトグラフ法
メチルパラチオン	検出せず	0.05ppm	ガスクロマトグラフ法
ヒ素 (As として)	検出せず	0.1ppm	DDTC-Ag 吸光光度法
鉛	検出せず	0.05ppm	原子吸光光度法
カドミウム	検出せず	0.01ppm	原子吸光光度法
総水銀	検出せず	0.01ppm	還元酸化原子吸光光度法
スズ	検出せず	1ppm	ポーログラフ法
総クロム	検出せず	0.5ppm	ジフェニルカルバジド 吸光光度法
シアン	検出せず	0.1ppm	ピリジンピラゾロン 吸光光度法

【0040】食品規格基準分析試験

この分析試験は本発明が食品（清涼飲料水）として適合しているかを検査する為の分析試験である。この試験は財団法人 日本食品分析センターで行った。使用液は、*

*LNB2000を使った。この結果清涼飲料水としての適合する事が解った。

【表12】

分析試験項目	結果	検出限界	分析方法
一般細菌数 (生菌数)	30 以下 / ml		標準寒天平板培養法
カビ数	陰性 / 1ml		ポテトキストマス(10%)
酵母数	陰性 / 1ml		寒天平板培養法
			ポテトキストマス(10%)
			寒天平板培養法
清涼飲料水の成分規格			
混濁	適		
沈殿物	適		
ヒ素 (As ₂ O ₃ として)	適		
鉛	適		
カドミウム	適		
スズ	適		
	(検出せず)	25ppm	
大腸菌群	適		

食品、添加物などの規格基準（昭和34年厚生省告示第370号）の

第1食品 D各条○清涼飲料水によった。

【0041】ラットにおける急性口毒性試験

食品規格基準のテストに使用した同じ液（LNB2000）でラットにおける急性口毒性試験（MSDS用試験）を行った。この試験は財団法人 食品農薬薬品安全評価センターにて行った。

【0042】試験方法

試験動物として雄2匹のSlc:wistar系ラット（SPF）を用いて試験を実施した。投与量は2000mg/kgの1用量を設定し、注射用水で希釈した被験物質を投与前16時間絶食した動物に胃ゾンテを用いて単回経口投与した。投与後の観察機関は7日間とし、動物の生死、一般状態及び体重推移について観察すると共に、観察終了時に病理解剖検査を行った。

【0043】試験結果

1. 死亡率 (Table 1) 観察期間中に死亡例は認められなかった。
 2. 一般状態 (Table 2) 観察期間中いずれの動物にも異常は認められなかった。
 3. 体重 (Table 3) 観察終了時の体重は、いずれの動物も投与時と比して順調に増加していた。
 4. 剖検所見 (Table 4) 観察終了時の剖検所見で、いずれの動物にも異常は認められなかった。
- 以上の結果から、本試験条件下におけるLNB2000のSlc:Wistar系ラット（SPF）における急性口毒性は弱く、LD50値は2000mg/kg以上であった。

【表13】

Table 1. Mortality

Sex	Group	Dose level (mg/kg)	Number of Animals	Number of deaths on the							Mortality (%)
				1	2	3	4	5	6	7	
Male	1	2000	2	0	0	0	0	0	0	0	0

L D₅₀ > 2000 mg/kg

【表 14】

Table 2. Clinical observation

Sex: : Male Dose level : 2000 mg/kg Number of animals : 2

Sings	Hours						Days						
	1	2	3	4	5	6	2	3	4	5	6	7	
Normal	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	
Dead													
Number of Affected Animals : 0												Mortality : 0/2	

【表 15】

Table 3. Body weight

Sex : Male (unit : g)

Sex : Male				
Group	Dose level (mg/kg)	Animal ID-No.	Days after administration	
			0	7
1	2000	1101	117	168
		1102	118	171
		Mean \pm S.D.	118 \pm 1	170 \pm 2

【表 16】

Table 4 Gross finding

Sex : Male Dose level : 2000 mg/kg

Animal ID-No.	Classification	Days Administration	Organ	Findings And comments
1101	Sacrificed	7		Normal
1102	Sacrificed	7		Normal

【0044】ウサギを用いた皮膚・次刺激性試験
重金属及び毒物分析試験に用いた LHB 2000 を用い
て、上記の試験を財団法人 食品農医薬品安全性評価セ
ンターで行った。

【0045】試験方法
この検査を行う為に 1 匹の Kbs : NZW 種雌ウサギ
(Healthy) を用いて試験を実施した。0.5m
l の被験物質を塗布した 6cm² のフランネルパッチを

40 動物の背部左側に 4 時間閉鎖パッチし、パッチ除去後 7
2 時間まで観察した。

【0046】試験結果
パッチ除去後 1, 24, 48 及び 72 時間のいずれの観
察においても皮膚反応は認められなかった。以上の結果
から、本発明のウサギの皮膚に対して刺激性がないと判
断した。

【表 17】

Table 1. Primary skin irritation in rabbit

Anim ID-No.	Treatment	Type of Response	Time after removal of dressing			
			1 h	24 h	48 h	72 h
2101	Test substance	Erythema	0	0	0	0
		Edema	0	0	0	0
Primary irritation index:0.0						

h:hours(s)

The PII (Primary irritation index) is calculated by averaging the erythema values and averaging the edema values at 1 and 48 hours then combining the averages (maximum PII=8)

【0047】モルモットを用いた皮膚感作性試験
同じく、LHB2000を用いて、上記の試験を財団法人 食品農医薬品安全性評価センターで行った。

【0048】試験方法

この検査を行う為、Std:Harley系 雌モルモット(クリーン動物)10匹を用いて試験を実施した。(Maximization法)感作群では殺菌・消臭剤LHB2000とFCAの混合物をモルモットの皮内に注射し、1週間後に25%に蒸留水で希釈したLHB2000、0.2mlを染込ませたフランネルパッチを5匹のモルモットの胸背部(2×4cmの範囲)に

24時間閉鎖貼付し、惹起開始後48時間及び72時間に皮膚反応を観察した。非感作群では感作処置は行わず、惹起時には感作群と同様の処置を行った。

【0049】試験結果

その結果、感作群、非感作群ともに惹起開始後48時間、72時間のいずれの観察においても皮膚反応は認められなかった。以下の結果から、本試験の条件下において、LHB2000はStd:Harley系モルモット(クリーン動物)の皮膚に対して皮膚感作性がないと判断した。

【表18】

Table 1. Mean daily scores for skin sensitization

Com Pound	Concentration		Number of Animals	Time After Challenge		Incidence of positive skin response
	Induction	Challenge		48h	72h	
LHB 2000	25%	25%	5	0.0	0.0	0/5
	—	25%	5	0.0	0.0	0/5

Positive ratio
(%)
0
0

h:hours

【表19】

Table2. Summary of body weight

(unit:g)

Com Pound	Concentration		Number of Animals	Days after initial adminisitation	
	Induction	Challenge		0	25
LHB 2000	25%	25%	5	352±15	489±26
		25%	5	351±36	503±40

Mean±S. D.

【表20】

Appendix 1 Individual scores for skin sensitization

Com Pound	Concentration		Animal I D-No.	Time after challenge	
	Induction	Challenge		48h	72h
LHB 2000	25%	25%	2101	0	0
			2102	0	0
			2103	0	0
			2014	0	0
			2105	0	0
	25%	25%	2201	0	0
			2202	0	0
			2203	0	0
			2204	0	0
			2205	0	0

h:hours

【表21】

Appendix 2. Body weight of individual animals

(unit:g)

Com Pound	Concentration		Animal I D-No.	Days after initial adminisitation	
	Induction	Challenge		0	25
LHB 2000	25%	25%	2101	352	482
			2102	366	521
			2103	365	511
			2014	330	472
			2105	346	461
	25%	25%	2201	397	526
			2202	367	552
			2203	347	485
			2204	345	448
			2205	299	502

h:hours

【0050】細菌を用いる復帰突然変異スクリーニング試験

本発明であるLHB2000の遺伝子突然変異誘発性(発ガン性)の有無を検討する為、ネズミチフス菌(*Salmonella typhimurium*)のTA100及びTA98を用いて、上記の試験を財団法人食品農医薬品安全性評価センターで行った。この試験は発ガンテストの一種である。

【0051】試験結果

LHB2000の処理群において、直説法(−S9mix)ならびに代謝活性化法(+S9mix)のいずれの

40 菌株とも溶媒対照に比較して、明確な復帰突然変異コロニー数の増加傾向は観察されず、試験菌株に対する生育阻害作用も観察されなかった。復帰突然変異により生じたコロニー数について、直説法ならびに代謝活性化法の各被験物質処理群とも、溶媒対照群の値と比較して明確な差は認められなかった。又、試験菌株に対する生育阻害作用については、いずれの処理群においても観察されなかった。一方、陽性対照物は各試験菌株に対し、復帰突然変異を顕著に誘発した。なお、コロニー計数時、被験物質の析出等の特筆すべき変化は認められなかった。

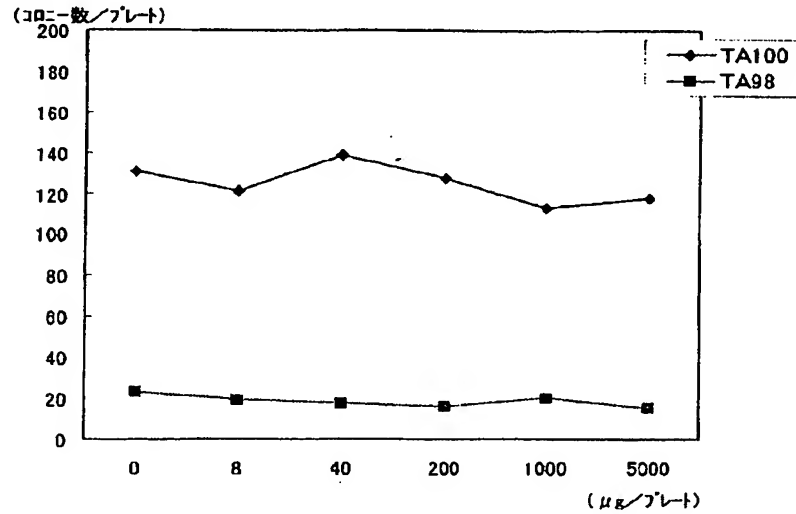
50 以上のスクリーニング試験結果から、本試験条件下に

て、LHB2000の細菌に対する遺伝子突然変異誘発性は陰性と考えられた。

【表22】

被験物質名：Gクリーン殺菌消臭剤LHB2000

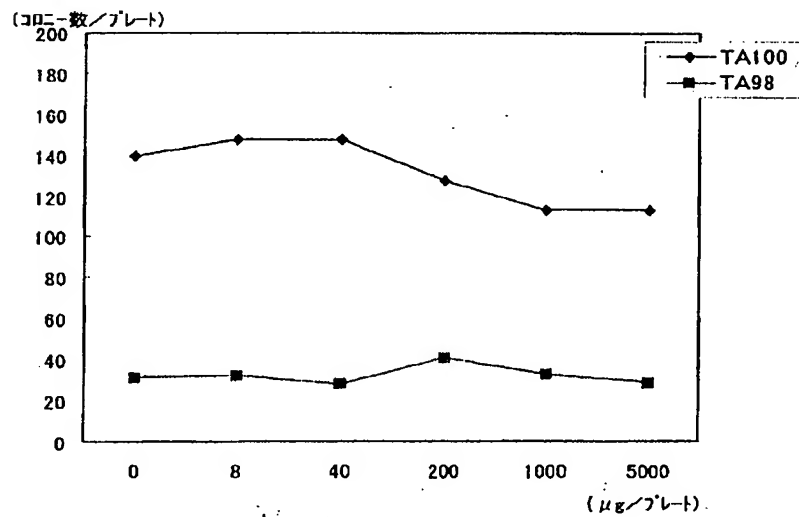
量-反応曲線 (S9-)



【表23】

被験物質名：Gクリーン殺菌消臭剤LHB2000

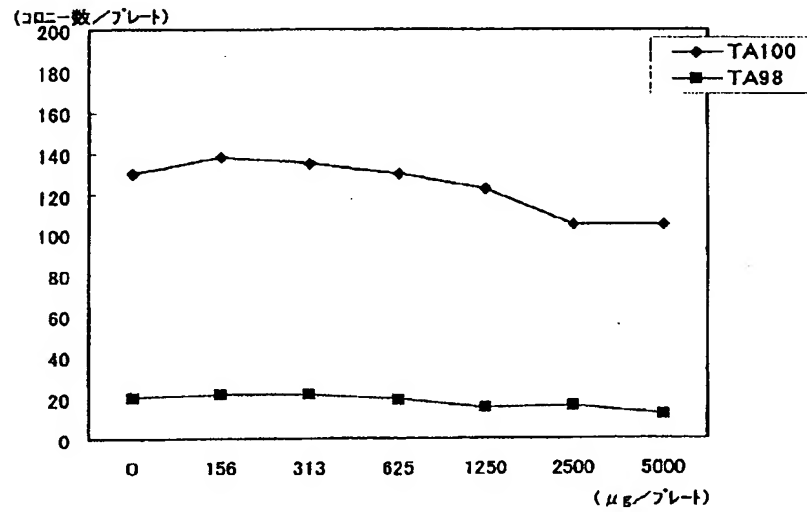
量-反応曲線 (S9+)



【表24】

被験物質名：Gクリーン殺菌消臭剤LHB2000

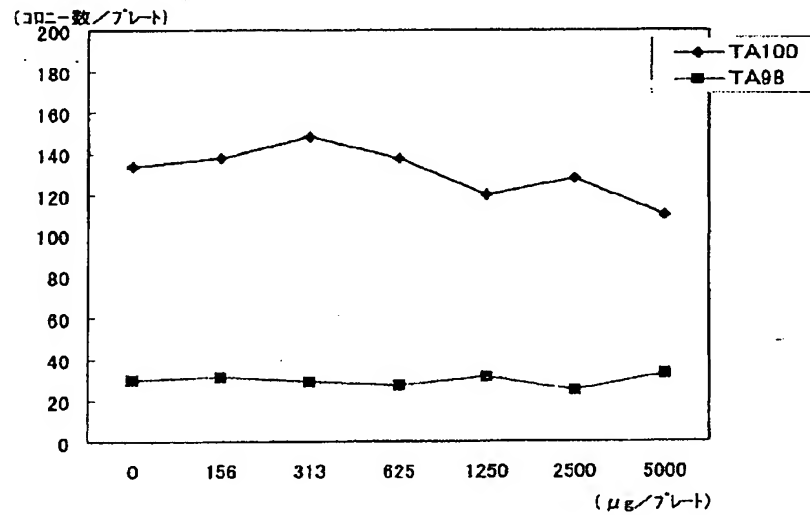
量-反応曲線 (S9-)



【表25】

被験物質名：Gクリーン殺菌消臭剤LHB2000

量-反応曲線 (S9+)



【表26】

濃度設定試験結果表

被験物質の名称: G クリーン殺菌・消臭剤 LHB2000

代謝活性化 糸の有無	被験物質濃度 (μ g/プレート)	復帰変異数 (コロニー数/プレート)	
		塩基対 置換型	フレーム シフト型
		TA100	TA98
S 9 Mix (-)	溶媒対照	133 128 (131)	22 24 (23)
	8	122 120 (121)	21 17 (19)
	40	140 138 (139)	17 18 (18)
	200	125 131 (128)	17 15 (16)
	1000	114 112 (113)	21 18 (20)
	5000	118 117 (118)	14 15 (15)
		136 143 (140)	31 30 (31)
	8	152 143 (148)	32 31 (32)
S 9 Mix (+)	40	153 142 (148)	28 27 (28)
	200	132 124 (128)	41 40 (41)
	1000	113 113 (113)	36 29 (33)
	5000	111 115 (113)	30 27 (29)
陽性対照	名 称	A F-2	A F-2
	濃 度 (μ g/プレート)	0.01	0.1
	コロニー数/プレート数	377 363 (370)	747 718 (733)
	名 称	2-AA	2-AA
S 9 Mix を 必要とする もの	濃 度 (μ g/プレート)	1.0	0.5
	コロニー数/プレート数	683 688 (686)	203 196 (200)

【表27】

試験結果表

被験物質の名称: G クリーン殺菌・消臭剤 LHB2000

代謝活性化系の有無	被験物質濃度 ($\mu\text{g}/\text{プレート}$)	復帰変異数 (コロニー数/プレート)	
		塩基対置換型	フレームシフト型
		TA100	TA98
S 9 Mix (-)	溶媒対照	128 134(131)	20 19 (20)
	1 5 6	139 137 (138)	20 23 (22)
	3 1 3	134 135 (135)	23 20 (22)
	6 2 5	131 128 (130)	19 18 (19)
	1 2 5 0	119 127 (123)	15 15 (15)
	2 5 0 0	103 107 (105)	16 16 (16)
	5 0 0 0	108 102 (105)	12 12 (12)
S 9 Mix (+)	溶媒対照	136 130 (133)	30 30 (30)
	1 5 6	133 140 (137)	30 31 (31)
	3 1 3	153 142 (148)	27 31 (29)
	6 2 5	142 132 (137)	24 29 (27)
	1 2 5 0	118 121 (120)	31 30 (31)
	2 5 0 0	130 126 (128)	25 24 (25)
	5 0 0 0	110 110 (110)	36 30 (33)
陽性対照	名 称	A F -2	A F -2
	濃 度 ($\mu\text{g}/\text{プレート}$)	0.01	0.1
	コロニー数/プレート数	408 412 (410)	698 686 (692)
	名 称	2-AA	2-AA
	濃 度 ($\mu\text{g}/\text{プレート}$)	1.0	0.5
	コロニー数/プレート数	647 650 (649)	197 219 (208)

【0052】ラットを用いた吸入有害性試験

本発明であるLNB2000に対する吸入有害性を検討する為、Slc:Wistar系ラット(SPF)雄3匹(7週齢)を用いて試験を実施した。この試験は財団法人 食品農医薬品安全性評価センターで行った。

【0053】試験方法

図面の図1の設備を使用し、吸入暴露チャンバー(W40×D100×H40cm)に動物3匹を入れ、7時間連続吸入暴露した。被験物質の噴霧気化は、チャンバー内に内蔵された気化式加湿器(定格加湿能力 350ml/h)を用いて行った。動物への吸入暴露は、チャンバー内の気化濃度が安定したと思われる噴霧1時間後より連続7時間行った。暴露期間中、動物には餌および水を与えなかった。又、吸入暴露中のチャンバー内の温度は22.5~23.0℃、湿度は70.0~70.5%

5%であった。暴露後の観察は、暴露開始後8時間まで毎時間、その後1H1回7H間行った。体重は暴露直前および観察終了時に測定した。病理解剖検査は観察終了時に行った。

40 【0054】試験結果

1. 死亡率 暴露期間中及び暴露後7日間、死亡例は認められなかった。
2. 一般状態 暴露期間中及び暴露後7日間の観察においていずれの動物にも異常は認められなかった。
3. 体重 観察終了時の体重は、いずれの動物も暴露直前体重と比較して順調に増加していた。
4. 剖検所見 観察終了時の剖検所見で、いずれの動物にも異常は認められなかった。

以上の結果から、本試験条件下におけるLNB2000のSlc:Wistar系ラット(SPF)に対する吸

入有害性は認められなかった。

【表28】

Table 1. Mortality

Sex	Group	Number of Animals	Number of deaths on the							Mortality (%)
			1	2	3	4	5	6	7	
Male	1	3	0	0	0	0	0	0	0	0

【表29】

Table 2. Clinical Observation

Sex: : Male

Number of animals : 3

Sings	Hours										Days						
	1	2	3	4	5	6	7	8	2	4	2	3	4	5	6	7	
Normal	3	3	3	3	3	3	3	3	3	3	3	3	3	3	3	3	
Dead																	
Number of affected animals:0										Number of recovered animals:0							Mortality:0/3

【表30】

Table 3. Body weight

Sex : Male

(unit : g)

Group	Animal ID-No.	DayS after administration	
		0	7
1	1101	143	180
	1102	155	188
	1103	144	176
Mean±S.D.		147±7	181±6

【表31】

Table 4 Gross finding

Sex : Male

Animal ID-No.	Classification	Days after Administration	Organ	Finding and comments
1101	Sacrificed	7		Normal
1102	Sacrificed	7		Normal
1103	Sacrificed	7		Normal

【0055】ウサギを用いた眼一次刺激性試験

本発明のLHB2000を用いてウサギに対する眼一次刺激性を検討する為、1匹のKbs: NZW種雌ウサギ (Healthy) を用いて試験を実施した。この試験は財団法人 食品農薬品安全性評価センターで行った。

【0056】試験方法

0.1mlの被験物質を動物の右眼に処置し、処置後72時間まで眼性刺激性について観察した。なお、左眼は無処置対照とした。

【0057】試験結果

50 その結果、被験物質処置後1から72時間までのいずれ

の観察においても角膜、虹彩および結膜ともに異常は認められなかった。以上の結果から、本試験条件下においてLHB2000はウサギの眼に対して刺激性がないと*

*判断した。

【表32】

Table 1. Primary ocular irritation scores in rabbit

Animal number Time after treatment:	2101			
	1h	24h	48h	72h
Cornea				
A=Degree of opacity	0	0	0	0
B=Area of opacity	0	0	0	0
Score $A \times B \times 5$	0	0	0	0
Iris				
A=Values	0	0	0	0
Score $A \times 5$	0	0	0	0
Conjunctivae				
A=Redness	0	0	0	0
B=Chemosis	0	0	0	0
C=Discharge	0	0	0	0
Score $(A+B+C) \times 2$	0	0	0	0
Total score	0	0	0	0

H:hour(s)

【0058】以上多くの安全性を証明するテストをもって、本発明の殺菌剤は安全である事が証明されたと言える。なお、このテストで使用した3種の殺菌剤の配合は以下の通りである。

(LHB・LNBは製造記号)

LHB2000:水1000gに対してヒノキチオール2g、アロエ1.5g、緑茶1.2g、熊笹0.3g、ドクダミ0.3g

LNB2000:水1000gに対してヒノキチオール2g、アロエ1.5g、緑茶1.2g、熊笹0.3g、ドクダミ0.3g

LNB1000:水1000gに対してヒノキチオール1g、アロエ0.75g、緑茶0.6g、熊笹0.15g、ドクダミ0.15g

【0059】

【発明の効果】以上説明したように、本発明は殺菌効果も高く、又多くの安全性試験でも証明されており、食品に直接塗布・噴霧又は浸漬する事により、発明の課題を解決する事が証明された。製品としての実用化もヒノキ

チオールを高濃度、水溶化出来る事により、工場レベルでの使用が可能となり、食中毒の防止範囲が広がった。又、食肉用の殺菌、家畜の飼料への添加等多くの用途を得る事が出来る様になった。

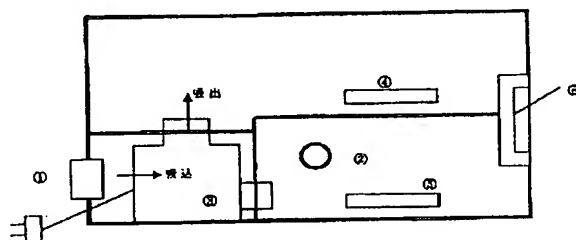
30 【図面の簡単な説明】

【図1】アクリル製の透明ケース(40×40×100cm)で①②より外気を入れ、③の気化器によって内部の空気を循環させ、④⑤に検体の人ったシャーレを置く。⑤の部分に実験用動物を放ち、気化された空気を与える。この時に気化器内にテスト用水溶液(薬液)を入れ、この液を気化させ循環させる。⑥はケース内部の温度と湿度を計測する為に取り付けた。

【符号の説明】

- 1 外気吸込口(気化器用)
- 2 外気吸込口(実験被擬体用)
- 3 気化器
- 4 水溶液シャーレ(検体)
- 5 水溶液シャーレ(検体)又は実験用動物
- 6 温湿度計

【図1】



フロントページの続き

(51) Int. Cl. 7

A 2 3 K 1/16
A 2 3 L 3/3472

識別記号

3 0 4

F I

A 2 3 B 4/00
4/14

ノート (参考)

H
Z